Feel so Bio キットシリーズ

#009 DNA 電気泳動キット

取扱説明書

1-100-009

目次

本キットの特徴 ･･･ 3

使用時に必要な試薬･機材等の一覧 ･･･ 4

内容物について ･･･ 5

事前準備 ･･･ 6

実験手順 ･･･ 8

ポイント･片付け ･･･ 9

付録 1　アガロースゲル電気泳動の原理 ･･･ 10

付録 2　マイクロピペットの使い方 ･･･ 13

付録 3　DNA 観察の推奨方法 ･･･ 14

付録 4　予想される DNA 断片の電気泳動像 ･･･ 15

本キットの特徴

本キットは、アガロースゲル電気泳動法による DNA サンプルの検出と分析を体験するキットです。

本キットでは、大腸菌のラムダ・ファージの DNA を制限酵素によって処理することで得られた DNA 断片をアガロースゲル電気泳動法で分離します。本キットの実験を通し、DNA の化学的・電気的性質やアガロースゲル電気泳動法の原理を詳しく学ぶことができます。

キット使用時に必要な試薬機材の一覧

キット内容 【生徒 20 名（2 人一組）分】

・DNA サンプル 1	70 µl
・DNA サンプル 2	70 µl
・ローディングバッファー	110 µl
・アガロース	3 g
・40 倍濃縮泳動バッファー	50 ml
・マイクロチューブ	50 本
・取扱説明書（本書）	1 冊

本キット以外に必要な試薬・機材一覧

・精製水	975 ml
・氷	500 g 程度
・マイクロピペット 20 µl 用	5 本（各班 1 本）
・マイクロピペット用チップ	5 箱（各班 1 箱）
・電気泳動槽	2～5 個

ミニゲル（8 穴）を 2 個泳動できれば実験可能です。

※機材につきましては弊社で販売およびレンタル(有料)を行っております。ご入用の際にはお問合せください。

簡易電気泳動セット（特別付録品）

・簡易電気泳動槽（組み立て必要）	1 個
・青色 LED ライト（組み立て必要）	1 個
・蛍光観察フィルム（黄色）	1 個
・簡易電気泳動槽作製書	1 部
・青色 LED ライト作製書	1 部

※簡易電気泳動を扱う際には感電にご注意ください。

※確実な実験結果を得るためには、市販品の電気泳動槽のご使用をおすすめいたします。

内容物について

DNA サンプル 1

制限酵素 *Hin*dIII で切断したラムダ・ファージ DNA です。10 μg の DNA が 70 μl の TE バッファーに溶けています。-20 °C にて保存してください。

DNA サンプル 2

制限酵素 *Eco*RI で切断したラムダ・ファージ DNA です。 10 μg の DNA が 70 μl の TE バッファーに溶けています。-20 °C にて保存してください。

精製水

DNA 分解酵素および RNA 分解酵素が含まれていない精製水です。-20 °C にて保存してください。

アガロース

核酸、タンパク質などの生体高分子を完全に除去した精製アガロースです。高温多湿をさけ、常温にて保存してください。

ローディングバッファー

DNA サンプルを電気泳動する際に使用します。-20 °C にて保存し、使用前に氷上で融解させてください。色素を含み、衣服につくと落ちにくいので、取り扱いには十分にご注意ください。 また、このローディングバッファーには泳動後の DNA 観察のための DNA 染色試薬が含まれています。蛍光色素ですので、できれば暗所にて保存をしてください。

40 倍濃縮電気泳動バッファー

40 倍の濃度に濃縮した TAE（トリス-酢酸-EDTA）バッファーです。アガロースゲルの作成および、DNA サンプルをアガロースゲル電気泳動法により分離する際の泳動バッファーとして使用します。4℃にて保管してください。電気泳動用バッファーとして使用の際は、精製水で 40 倍に希釈してご使用ください。

事前準備

班構成

本実験キットでは 4 人 1 班（実験は 2 人 1 組）を推奨しています。

機材一班分

DNA サンプル 1	10 µl
DNA サンプル 2	10 µl
ローディングバッファー	10 µl
マイクロピペット　20µl 用	1 本
マイクロピペット用チップ	1 箱

（全体で 1 セット用意するもの）

電気泳動バッファー	300 ml（40 倍希釈）
電気泳動槽	1～2 台
アガロースゲル（8 穴）	2 個

※使用する電気泳動層により必要量が変わります。本実験では、株式会社アドバンスの電気泳動層、Mµpid 2plus の使用を想定しております。

電気泳動実験の準備

1) 電気泳動（1×TAE）バッファーの作成

40 倍濃縮泳動バッファー25 ml を 975 ml の水で 40 倍に希釈します。本キットで使用を推奨している電気泳動槽 Mupid-2 Plus では、電気泳動バッファーを約 300 ml/台（ゲルが浸る程度） 使用します。

2) アガロースゲルの作製

i) 300 ml の三角フラスコに 1.4 g のアガロースを入れ 1）で作成した電気泳動バッファー200 ml を加えよく混ぜます。三角フラスコの口をラップで閉じ電子レンジで加熱してアガロースを完全に融解させます。この作業はアガロースの粒子が見えなくなるまで行ってください。加熱の際は、沸騰による噴出に注意してください。なお、この作業は水蒸

気によるやけどの危険性がありますので、必ず指導者が行なってください。なお、軍手の上にビニール手袋をして作業を行うことで火傷の危険性を下げることが出来ます。

2) 溶解させたアガロースは、電気泳動槽付属のゲルメーカーを用いて成型します。2.で融解したアガロースを、50 °C 程度まで冷ました後、ゲルメーカーに流し込み、上からウェルを作製するためのコームを差し込みます。アガロースが固まるまで上からアルミホイルで覆い、静置してください。

※ 200 ml のアガロース溶液で、小さいゲルが約 8 枚、大きなゲルでは 4 枚作製できます。ゲルメーカーが 1 個しかない場合で、小さいゲルを 4 枚以上作製したいときには、1）のステップで、0.7 g のアガロースを 100 ml の電気泳動バッファーに溶かすなどして、小分けにゲル作製を行ってください。電気泳動槽 1 台で行う場合は、17 穴のゲルを 1 枚作成し、1 班 3 ウェルずつで 1 枚のゲルを使うようにします。また、一度固まってしまったゲルでも、再度温めることで溶解し、ゲルを作製することが可能です。

作製したアガロースゲルは、希釈後の電気泳動バッファーに浸した状態で 1 ヶ月程度常温保存が可能です。また、使用前にはウェルの底に穴が開いていないことを目視で確認してください。

3) 試薬の準備

マイクロピペットを使って、DNA サンプルを 10µl、ローディングバッファーを 10 µl ずつマイクロチューブに分けます。

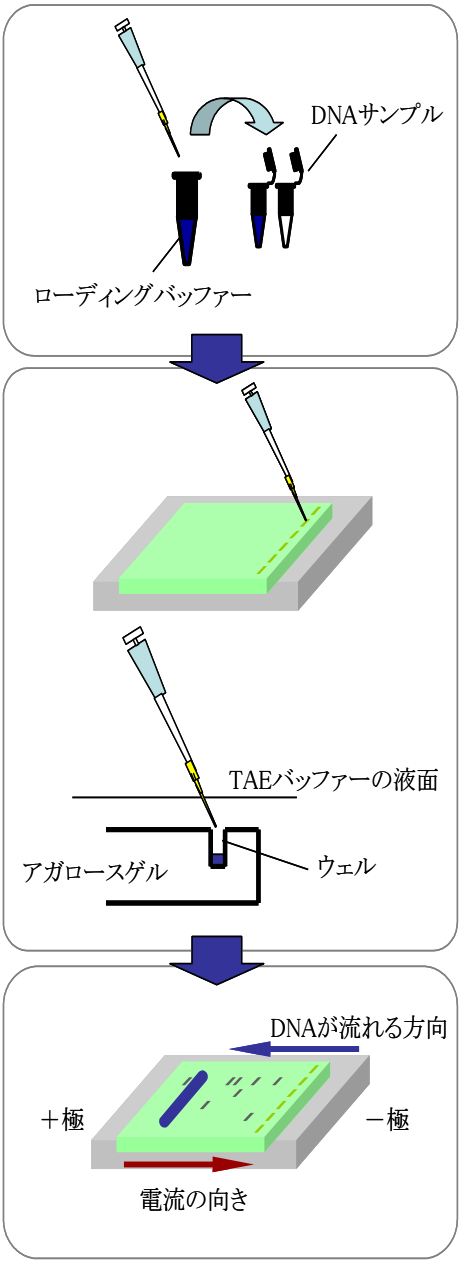
実験手順

1) 電気泳動槽の準備

電気泳動槽に電気泳動バッファーを加え、電気泳動槽内のマイナス極側にウェル（穴）が来るようにアガロースゲルをセットします。アガロースゲルが電極と平行になるようにセットしてください。使用する電気泳動バッファーの量は、電気泳動槽によって異なりますので、電気泳動槽の取扱説明書に従い、適切な量をご使用ください（参考：Mupid-2Plus では約 300 ml 程度）。

2) DNA サンプルの調製

本キット添付のローディングバッファーを 4 µl ずつ DNA サンプルに加えよく混ぜます（合計 14 µl）。



3) DNA サンプルの注入（アプライ）

DNA サンプルを別々のウェルにアプライします。アプライは、右図のようにチップの先をウェル内まで入れないようにします。チップの先端でウェルを破壊しないよう、細心の注意を払ってください。

4) アガロースゲル電気泳動

電気泳動槽の電源スイッチを入れ、電気泳動を開始します。DNA はプラス極側に移動します。くれぐれも感電にご注意ください（参考：Mupid-2 Plus での電気泳動条件は 100 ボルトで 20 分程度）

5) アガロースゲルの DNA 観察

p14 の「付録 3 DNA 観察の推奨方法」をご覧ください。

指導のポイント

1) DNA を注入するためのウェルは非常に小さいため、初めて電気泳動を行う場合は、マイクロピペットのチップを刺してゲルに穴を開けてしまったり、うまく DNA サンプルを入れられずに失敗する可能性があります。ゲルを多めに作っておき、実験前に手で触って固さを確かめさせたり、水で希釈したローディングバッファーを使って注入の練習をするといいでしょう。
2) アガロースゲルはもろく割れやすいため、扱いには注意が必要です。特に染色時はゲルトレイから外す必要があるので、伸長に扱う必要があります。固めのクリアファイルなどを適当な大きさに切り、ゲルすくいとして利用することもできます。
3) DNA の染色剤を扱うには、必ず手袋（サニメント手袋など）をつけて下さい。Mupid Blue は安全な試薬ですが皮膚につくとしばらくの間、色が落ちないことがあります。
4) 試薬が目や口に入った場合は水でよくすすぎ、気分が悪くなった場合は医師に相談してください。

片付け

1) 余った試薬類は、普通ゴミとして廃棄可能です。
2) 使用したチップやチューブはそのまま廃棄するとゴミ袋が破れてしまう可能性があるので、2 重にした小さな袋などにまとめて、プラスチックゴミとして廃棄して下さい。
3) 使用済みの電気泳動バッファーは、水道に流して捨てることができます。
4) 使用後のアガロースゲルは、袋などに密封して可燃ゴミとして廃棄できます。

付録 1　電気泳動の原理

アガロースゲル電気泳動法とは？

アガロースゲル電気泳動法は、DNA や RNA などの核酸をそれらの電気的な性質を利用して分離する方法です。核酸は「マイナス」の電荷を帯びているため、電場に置かれると、アガロース（※）のゲルの網目構造内(ゲルマトリックス)を＋極側に移動します。アガロースゲル電気泳動法では、長い DNA 断片はゲルマトリックス内をゆっくりと（引っかかりながら）動くのに対して、短い DNA 断片はより速く（あまり引っかからずに）動くことから、DNA 断片を長さによって分離することが可能です。この方法はバイオテクノロジーの研究において DNA 断片の精製の際に用いられる最もポピュラーな方法であり、現在のバイオテクノロジーを支える基本的な技術です。

※アガロースとは？

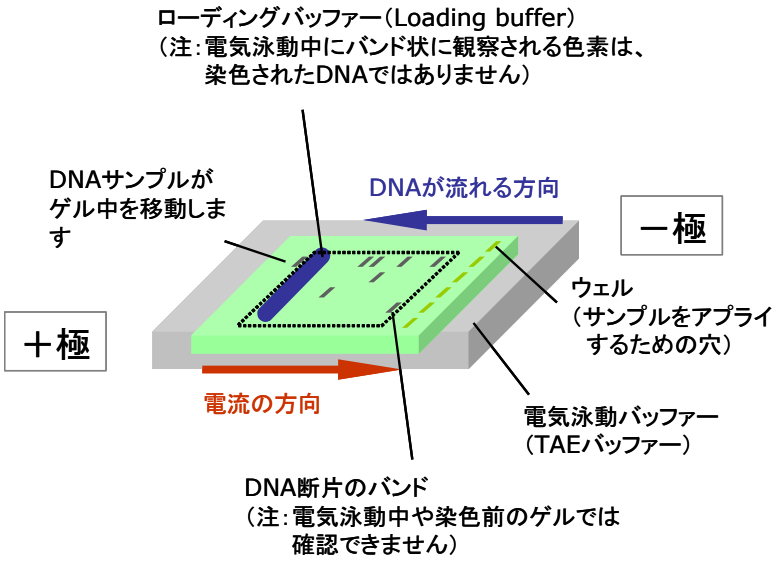
アガロースは、「寒天」の主要な成分です。2 種類の糖が結合しあって網目状の構造をとることから、生体高分子、特に DNA を分離する際によく利用されます。

DNA の電気的性質

DNA は、リン酸基・塩基・デオキシリボース（糖の一種）によってできる「ヌクレオチド」とよばれる分子が直鎖状につながった構造をとっています。このうちリン酸基と塩基が荷電しています。

DNA の場合、塩基の荷電は二重鎖構造をとるために打ち消されているので、水溶液中ではリン酸基のみが荷電しており、したがって DNA はヌクレオチド数、すなわち分子量（※）に比例したマイナスの電荷を持っていることになります。

※DNA はヌクレオチドが直鎖状につながった構造をとるため、分子量はそのヌクレオチド数に比例します（塩基の種類によって多少の誤差が生じます）。一般的に DNA の大きさは分子量で表さずヌクレオチドの長さ（塩基対数、base pair：bp）で表します。



上図は、アガロースゲル電気泳動法の模式図を示しています。アガロースゲル電気泳動を行う際には、サブマリン型電気泳動槽とよばれる機器を使用します。まず電気泳動槽を、導電性でかつ DNA の分解が起こりにくい電気泳動バッファーで満たし、その中にアガロースゲルを静置します。アガロースゲルには、ウェルとよばれるサンプルをアプライするための穴があり、マイクロピペットを用いてここに DNA サンプルをアプライします。

DNA サンプルを電気泳動する際には、あらかじめ DNA サンプルをローディングバッファーと混和します。これにより DNA サンプルは、泳動バッファー中に拡散することなく、ウェル内にアプライすることが可能となります。ローディングバッファーには、電気泳動中にサンプルの移動度の目安となる色素や、ウェルに DNA サンプルを沈ませるためのグリセロールなどが含まれています。

あらかじめ DNA 断片のサイズの分かっている DNA マーカーを「DNA のモノサシ」として隣のレーンに電気泳動することで、未知のサンプルの分子量を検討することも可能です。

電気泳動の終了後は、DNA 断片を可視化するために染色します。DNA 染色に用いられる試薬としては、エチジウムブロマイド（EtBr）、Mupid Blue などが挙げられます。EtBr は検出感度に優れていますが、DNA の 2 本鎖の間に入り込む（インターカレーションする）物質であり、

発がん性が認められます。また、DNA 断片のバンドの観察の際に紫外線ランプが必要となるため、ビニール手袋を必ず着用し、防護メガネを使用するなど、取扱いには十分な注意が必要です。本キットでは、安全な Mupid Blue の DNA 染色液の使用を推奨します。

電気泳動バッファー

DNA の電気泳動では、一般に TAE バッファーや TBE バッファーが用いられます。TAE バッファーは数千 bp 以上の比較的長い DNA 断片の分離に適しているのに対して、TBE バッファーはそれよりも短い DNA の分離に適しています。

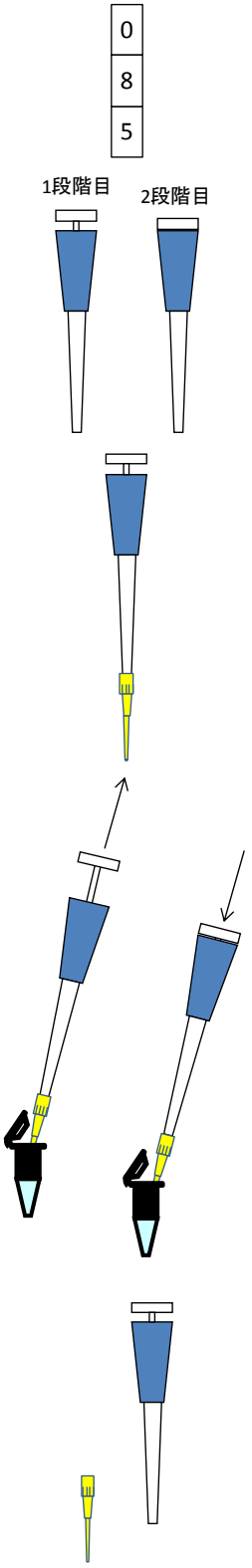
アガロースゲルの濃度

電気泳動法による DNA の分離実験では、ゲルの作成の際のアガロースの濃度が非常に重要となります。アガロースの濃度が上がれば上がるほどゲルマトリックス分子と DNA 断片の相互作用は強くなり DNA 断片の移動度が小さくなるため、より細かい DNA 断片の分離が可能となります。分離したい DNA 断片の長さによって適当なアガロース濃度を選択することが大切です。本キットでは、0.7 %のアガロースゲルを使用することを推奨しています。

アガロース濃度(%)	分離できる DNA 断片の長さ(bp)
0.6	1,000~20,000
0.7	800~10,000
1.0	500~7,000
1.2	400~6,000
1.5	200~3,000
2.0	100~2,000

付録 2　マイクロピペットの使い方

マイクロピペットは、微量の液体を正確に測り取るための器具です。使用方法はメーカーによって多少異なります。ここでは最も一般的なものについて説明します。



1)　目盛りを見ながら、数値が測り取りたい量になるまでダイアルを回してください。目盛りは、200 µl 用の場合は上から百の位、十の位、一の位、20µl 用の場合は十の位、一の位、1/10 の位になっています。例えば図のような目盛りの場合、200 µl 用だと 85 µl、20 µl 用だと 8.5 µl を示していることになります。

シャフトには軽い力で押し込める 1 段階目と、強い力で押し込める 2 段階目があるので、まずはそれを確認してください。試薬を取る際は 1 段階目で止めます。2 段階目まで押し込んでしまうと、設定した容量よりも多くの液体を吸ってしまいます。

2)　マイクロピペットの先端をチップの口に押し込み、しっかりとチップをはめてください。これで準備は完了です。

3)　シャフトを 1 段階目まで押し込んだ状態で、チップの先端を溶液中に入れてゆっくりとシャフトを上げると、チップ中に溶液が入っていきます。

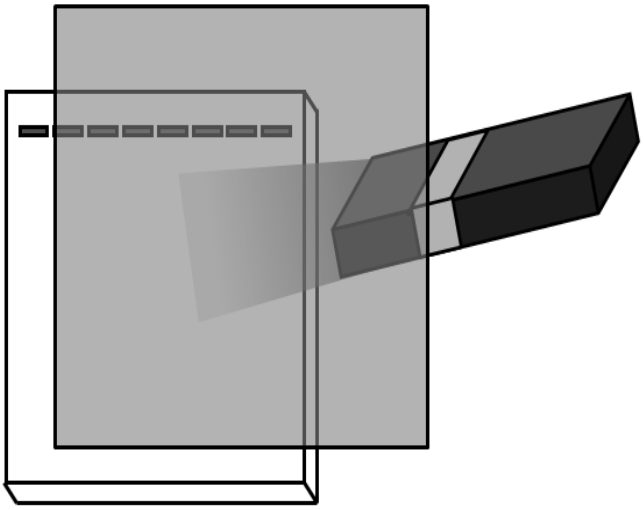
※ここで一気にシャフトが上がると、チップ中に空気が入りやすくなりますので注意してください。

4)　溶液を吸ったチップの先端を新しいチューブに入れてシャフトを押し込むと、溶液をはき出せます。このとき溶液を完全にはき出すために、シャフトを 2 段階目まで押し込んでください。シャフトを押したままチップの先を液体から出します。

5)　使用済みのチップをマイクロピペットから外して捨ててください。溶液の混入をふせぐため、異なる溶液を取る際は必ずチップを交換してください。

付録 3　DNA 観察の推奨方法

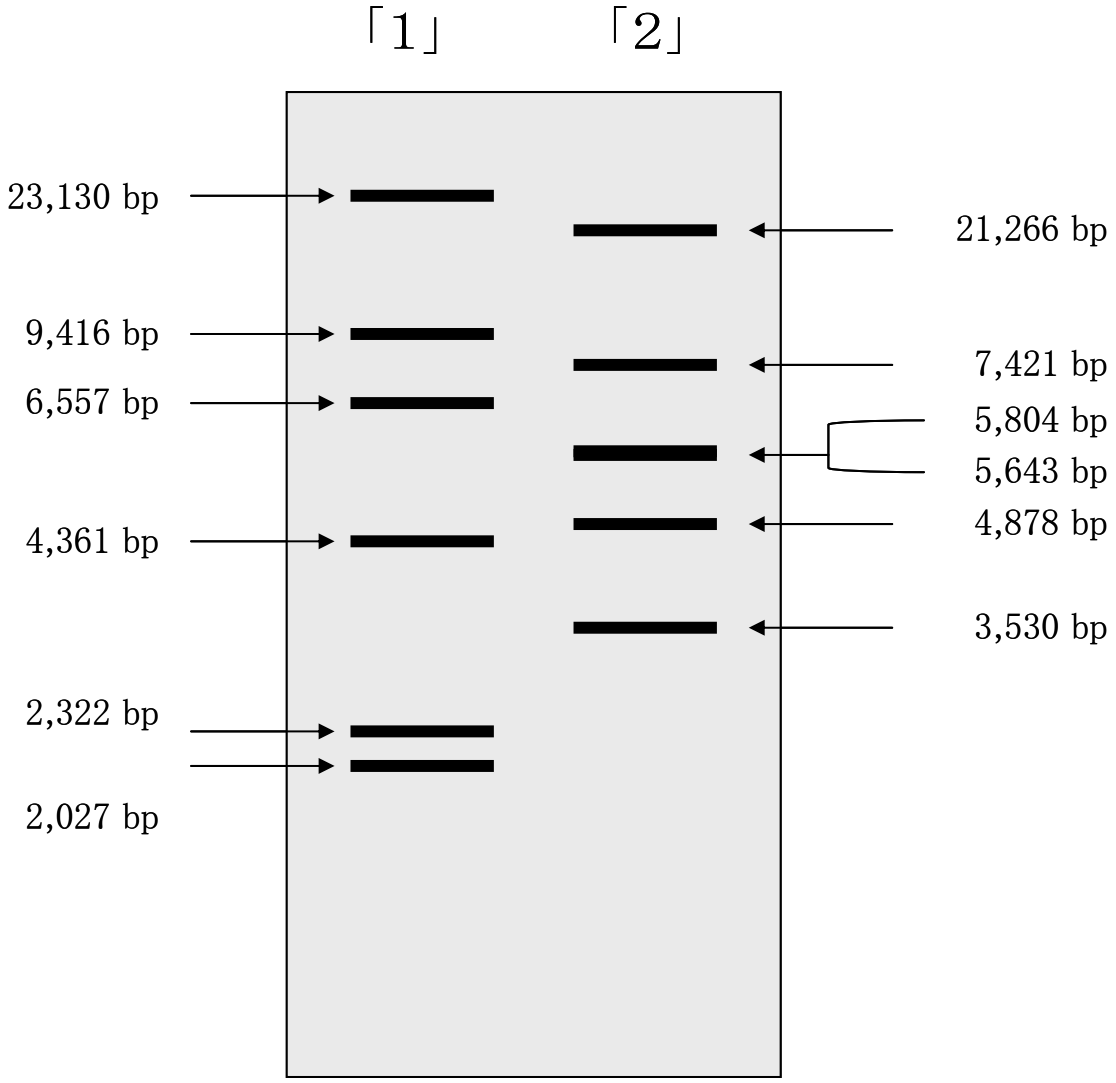
泳動槽からゲルを取り出し、青色 LED ライト（ブラックライト、紫外線でも可能）の光を当てます。ライトを当てている上から蛍光観察フィルム（黄色、セロファンでかまいません）をかぶせ、フィルムの上から観察します。



付録 4
予想される DNA 断片の電気泳動像

予想されるバンド像

本キットに含まれる DNA サンプル 1 および DNA サンプル 2 の 0.7% アガロースゲルにおける電気泳動のバンド像は下図のようになります。各バンドの横に DNA 断片の長さ(bp)を示します。



サイエンスレスキューFAX問合せ票

ご記入後
03-6277-8042
へご送付ください

＜お客様情報＞

お名前	学校名
ご連絡先：TEL	FAX

＜ご利用いただいたキット＞

キット名	

＜お問い合わせ内容＞

☐準備方法について　　☐実験方法について
☐実験結果について　　☐内容物について
☐授業での活用方法について　　☐その他（　　）

＜お問い合わせ内容について詳細お書きください＞

ご利用ありがとうございます。担当者より追ってご連絡いたします。

Leave a Nest

Feel so Ecoシリーズ　カスタマーサポート係
TEL：03-6277-8041　FAX：03-6277-8042
Mail：ed-kit@leaveanest.com

免責事項

本製品は、バイオ教育を目的として開発されたキットです。本取扱説明書に記載された手順以外でのご使用につき発生したいかなる損害に関して、当社は一切の責任を負いません。

商品のご返品について

商品のご返品につきましては、弊社の確認を必要とさせていただきます。この確認なしでのご返品はご遠慮ください。適切な保存、ご使用をされていない製品についてはご返品をお受けできない場合がございます。また、品質保持のために返品された製品を再販することは一切ございません。

アフターサポート『サイエンスレスキュー』

ご購入後 3 ヶ月間(ご購入月を含む)無料でご利用いただける、アフターサポートサービスです。大学や研究機関等でバイオの研究に携わる、若手研究者が実験手順や先端科学に関する知識面のサポートをいたします。

サポートを担当するのは、リバネスが実施する先端科学実験教室のノウハウを持つスタッフでもありますので、授業内で行う実験カリキュラム等に関するご相談も承っております。気軽にご利用いただけるサービスですので、少しでもご不明な点がございましたらぜひご利用下さい。

Feel so Bio シリーズ　カスタマーサポート係

TEL：03-6277-8041

FAX：03-6277-8042

Mail：ed-kit@leaveanest.com

※FAX をご利用の場合は、同封の FAX 用紙にご記入の上ご送信ください。

製造・販売元

Leave a Nest

お問い合せ先

〒160-0004
東京都新宿区四谷 2-11-6 VARCA 四谷 10 階
TEL 03-6277-8041
FAX 03-6277-8042
URL：http://www.leaveanest.com/

Leave a Nest